



Détection du virus de la rhizomanie de la betterave

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)

Test biologique

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE



Droits de reproduction et Copyright

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis gratuitement à la disposition des usagers du ministère chargé de l'agriculture en tant que méthode.

Le présent document est la propriété du ministère chargé de l'Agriculture, toute reproduction qu'elle soit totale ou partielle ne peut être effectuée qu'à la condition expresse que la source soit citée.

Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 18 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la méthode.

n°méthode Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
VS/04/07 version c	-	-	2007	Décembre 2010 + 3 ¹ mois
MOA 011 version1a	Août 2010	Octobre 2010	Décembre 2010	

¹ Pour la présente méthode, le délai de 18 mois n'est pas applicable. Il est ramené à 3 mois.

SOMMAIRE

PREAMBULE	4
Objet des méthodes officielles	4
Glossaire, abréviations et documents connexes	4
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus.....	4
Échantillonnage et échantillon	4
Modification des méthodes officielles	4
Considérations d'ordre métrologique.....	5
Obligations réglementaires et limites de responsabilité	5
Revue des méthodes officielles, amendement et modification	6
ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS.....	7
PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE....	8
Modifications	8
Améliorations	8
DESCRIPTION DE LA METHODE	9
1. Objet	9
2. Domaine d'application.	9
3. Présentation schématique de la détection.....	11
4. Produits et consommables	11
5. Appareillage et matériel	12
6. Contrôles et témoins	12
7. prise d'analyse (le cas échéant).....	13
8. Etapes de l'analyse	13
8.1. Test de piégeage	13
8.1.1. Analyses sur sol :.....	13
8.1.2. Analyses sur eau terreuse :.....	13
8.1.3. Analyses sur eau décantée.....	13
8.2. Dépotage.....	14
8.3. Préparation des échantillons pour analyse par ELISA	14
9. Résultats	14
10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants	14
11. Conservation des reliquats de matériels utilisés.....	15
LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE	16
BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE	17

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation...). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.

Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.

Certains documents (composition de milieux et tampons...) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

Le ministère chargé de l'agriculture peut proposer ou imposer aux laboratoires, agréés ou reconnus, de stopper l'analyse à une certaine étape précisée dans la méthode officielle et, le cas échéant, de transmettre le matériel nécessaire à la poursuite de l'analyse dans un autre laboratoire, agréé ou de référence. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de veiller à suivre les contraintes définies par son périmètre d'agrément ou de reconnaissance et par les exigences du ministère.

ÉCHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON

L'échantillonnage, est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.

L'échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.

Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES

Sur le principe, seules les méthodes officielles peuvent être utilisées dans le cas d'analyses officielles, sans aucune modification. Néanmoins, et afin que les laboratoires puissent mieux utiliser leurs ressources et valoriser leur expérience, la possibilité leur est laissée d'utiliser des méthodes dérivées ou alternatives, ou de remplacer un réactif-clé à la condition expresse que le LNR ait validé la modification.

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle...).

Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.

Un réactif-clé est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.

Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

Tout autre modification (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doit néanmoins faire l'objet d'une documentation apportant la preuve qu'elle n'interfère effectivement pas avec le résultat. Cette documentation est tenue en permanence à disposition du LNR.

Le ministère chargé de l'agriculture peut souhaiter faire profiter l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses officielles des avantages que peuvent représenter les méthodes dérivées et alternatives qui lui sont proposées, en intégrant certaines modifications à l'occasion d'une révision de la méthode officielle. Le laboratoire à l'origine de l'amélioration est, dans ce cas, cité dans la méthode officielle.

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte des méthodes).

Volume	volume < à 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ Volume \geq à 10 mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 u
Température	incubateur : EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$ réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ congélateur : $\leq -18^\circ\text{C}$ congélateur froid intense : $\leq -65^\circ\text{C}$
Longueur	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique ...).

Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.

Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'agriculture, de l'alimentation et de la forêt.

Les conditions de mise en œuvre des méthodes officielles ainsi que la qualité des réactifs-clé utilisés sont susceptibles de modifier la qualité des résultats obtenus avec les méthodes officielles. Ces deux derniers aspects relèvent de la responsabilité des laboratoires utilisateurs.

Le ministère chargé de l'agriculture ne saurait être tenu pour responsable dans le cas de mises en œuvre inadéquates, volontaires ou non des méthodes officielles.

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Les méthodes officielles sont revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».

Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE

Le laboratoire national de la protection des végétaux Station d'Angers remercie les anciens collègues du LNPV Unité de Flore Pathogène des Sols qui avaient évalué et rédigé la méthode VS/04/07 version c détection du virus de la rhizomanie de la betterave, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) par test biologique suivi du test ELISA et qui nous ont transmis les éléments de connaissance de la méthode. Dorénavant, l'équipe du laboratoire national de référence pour la détection du virus de la rhizomanie de la betterave est le LNPV, station d'Angers (7 rue Jean Dixméras – 49044 ANGERS CEDEX 01).

Le travail de relecture et de révision a été effectué par le pôle « Développement de méthodes » au sein de ce même laboratoire.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: la version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

MODIFICATIONS

Sans objet (première version publiée).

AMELIORATIONS

Rectifications concernant l'ajout de charbon végétal actif dans la préparation des pots pour les témoins (§ 6).

Précisions sur la limite inférieure en terme de pesée des sous-échantillons (§ 8-3)

Nota bene: les améliorations de pure forme (y compris les corrections grammaticales ou orthographiques) ne sont pas reprises dans cette synthèse des modifications.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Détection du virus de la rhizomanie de la betterave, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) - Test biologique

Introduction

Le virus de la rhizomanie de la betterave, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), est classé organisme de quarantaine et est visé par les annexes IB et IVB de la directive 2000/29/CE modifiée.

A ce titre, des analyses officielles de détection de ce virus doivent être effectuées sur les sols support de culture destinées à des zones protégées lors des échanges intra-communautaires.

La liste des zones protégées au regard de ce virus fait l'objet de décisions communautaires et est régulièrement actualisée.

1. Objet.

Cette méthode s'applique pour la détection en routine, dans le sol, sur eau terreuse ou décantée, du virus de la rhizomanie de la betterave : le Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), lui-même véhiculé par un protozoaire du sol (*Polymyxa betae*).

Le test biologique décrit dans la présente méthode vise à « piéger » le champignon éventuellement présent dans le sol et potentiellement porteur du virus sur une plante sensible en vue de la détection ensuite du virus sur cette plante hôte par ELISA (voir schéma de détection au point 3 ci-après).

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode s'applique à tout sol (ou eau terreuse ou décantée), matières fertilisantes et supports de culture dans la mesure où permettant un développement racinaire des plantes pièges suffisant pour réaliser le test dans les conditions définies ci-après.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode s'applique aux échantillons de sols (ou eau terreuse ou décantée) à tester puis aux racines et/ou tiges de betteraves cultivées sur ces milieux.

Attention, si les sols analysés ont fait l'objet de traitements herbicides avant leur prélèvement pour analyse, ceux-ci peuvent être susceptibles d'entraîner des difficultés de levée des plantules de betteraves pièges utilisées et donc d'empêcher la réalisation de l'analyse. Les sols à analyser doivent donc être prélevés si possible avant tout traitement herbicide.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

Prélèvement sur sol :

Un échantillon représente un prélèvement effectué sur le terrain de 2.5L de terre par hectare comme décrit ci-dessous.

Compte tenu du caractère « hétérogène en agrégats » (foyers) de la plupart des champignons du sol, la procédure formelle consiste à découper une parcelle en sous-unité de 1000 m² et à réaliser 10 prises de 250 mL (une tous les 100 m²) par sous-unités, regroupées en un échantillon.

Quand une parcelle n'est pas suspectée d'être contaminée, il est envisageable « d'élargir la maille » à raison d'un échantillon par hectare, constitué du regroupement de 10 à 15 prises de 250 mL. En revanche, en situation de zones potentiellement contaminées, le protocole de base (un échantillon = 10 prises sur 1000 m²) doit impérativement être respecté.

Remarque : Pour les grandes parcelles, et compte tenu des coûts engendrés, on ne retiendra que 3 échantillons, répertoriés sur un plan, par tranche de 10 hectares homogène.

Préparation de l'échantillon de sol pour envoi au laboratoire :

- Etiquetage identique au prélèvement de plantes avec repérage sur un plan.
- Ne jamais laisser les sacs au soleil ou à une température supérieure à 35°C, même momentanément.
- Stocker, si nécessaire avant envoi, au frais (cave) et au maximum un mois.
- Répartir les échantillons en containers résistants (caisses ou cartons opaques).
- Prévenir le laboratoire destinataire.

Cas particulier de l'eau terreuse :

Un échantillon d'eau terreuse se définit comme un échantillon de consistance liquide ou semi-liquide à forte teneur en éléments solides récupérables par décantation.

L'échantillon minimum doit pouvoir fournir 250 mL de phase solide après décantation.

Cas particulier de l'eau décantée :

Un échantillon d'eau décantée se définit comme un échantillon de consistance liquide à faible teneur en éléments solides.

Cet échantillon servira d'eau d'arrosage afin de contaminer, le cas échéant, la préparation initiale de terreau stérile + sable.

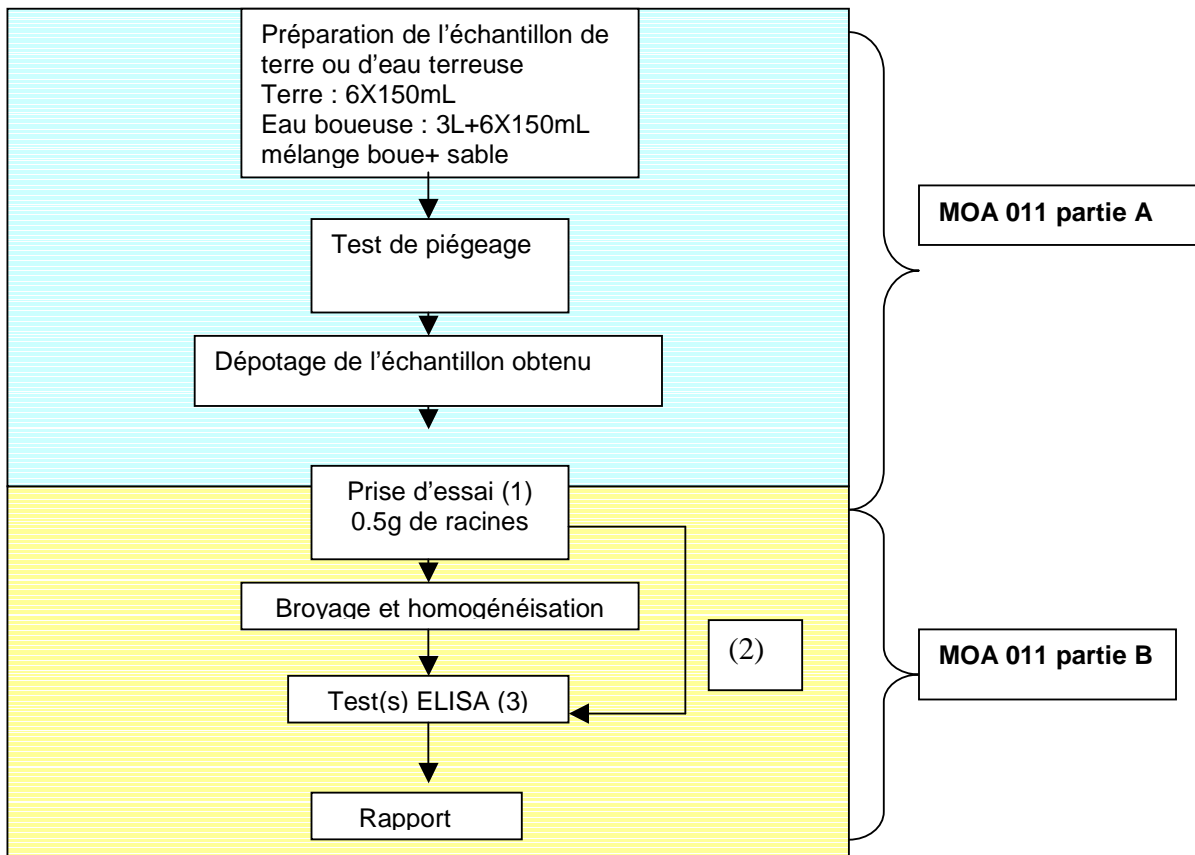
L'échantillon minimum est de 3 litres.

Précaution(s) particulière(s) à prendre.

Stocker l'échantillon pendant environ 6 mois sous abri (non climatisé) pour permettre un éventuel test complémentaire.

Le désinfecter avant élimination.

3. Présentation schématique de la détection



- (1) la première prise d'essai est à utiliser dans la journée, si une deuxième prise d'essai est possible, elle doit être conservée au congélateur ou au réfrigérateur après lyophilisation pour une éventuelle analyse supplémentaire ou complémentaire (lors d'une analyse ultérieure, le mode de conservation de cette deuxième prise d'essai doit être indiqué).
- (2) Le cas échéant, en cas d'analyse de confirmation, sur la deuxième prise d'essai (ou le broyat de la première prise d'essai)
- (3) Plusieurs tests ELISA peuvent être faits sur le même broyat, notamment en cas de résultat indéterminé

4. Produits et consommables

Rappel : En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera les plus optimales.

Pour la mise en œuvre de la présente méthode, le laboratoire sera amené à utiliser de :

- **l'Eau de qualité « analytique »** (i.e. déminéralisée, distillée, osmosée,...) garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

- **l'Ethanol 70°** (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray ND) : désinfection des surfaces de travail et du matériel.

5. Appareillage et matériel

Gros matériel :

- Chambre climatisée : 6000-10 000 lux (15h jour/9h nuit), humidité relative proche de 80%, T°C = 25°C ± 4°C.
- Centrifugeuse (2000 à 3000g) : facultatif
- Dessiccateur lent réglé à 25°C ± 5°C (peut être remplacé par un séchage à l'air libre).

Petit matériel :

- Sac plastique ou tout autre contenant étanche.
- Tamis à 5 mm (tamisage des terres).
- Nappe d'irrigation
- Godet percé : pot individuel de volume 150 mL.
- Barquette pouvant contenir 6 pots de 150 mL côte à côte.
- Papier absorbant
- Semences de betterave de variété sensible à la rhizomanie et enrobées de fongicide contre les fontes de semis
- sachets ?

6. Contrôles et témoins

Comme dans tout test biologique et/ou chimique, il est nécessaire d'intégrer des témoins sains et malades afin de vérifier le bon déroulement du test et de pouvoir en valider son fonctionnement.

Ces témoins sont constitués :

- de témoins sains (TS) :

Analyses sur sol: les témoins sains sont constitués de 3 pots de 150 mL de terreau stérile auxquels sont ajoutés, à chacun, 0.673g de charbon végétal actif.

Analyses sur eau terreuse : les témoins sains sont constitués de 3 pots de 150 mL avec un mélange de ¼ de terreau stérile pour ¾ de sable auxquels sont ajoutés, à chacun, 0.673g de charbon végétal actif.

Analyses sur eau décantée : les témoins sains sont constitués de 3 pots de 150 mL avec un mélange de ½ de terreau stérile pour ½ de sable auxquels sont ajoutés, à chacun, 0.673g de charbon végétal actif.

Ces témoins sains sont ensuite ensemencés avec des graines de betteraves sensibles à la rhizomanie dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Ils seront arrosés avec de l'eau permutée, distillée ou osmosée. Il est préférable d'effectuer les manipulations de ces témoins sains en premier afin d'éviter toute contamination ultérieure.

-des témoins malades (TM) :

Analyses sur sol: les témoins malades sont constitués de 2 pots de 150 mL de terre reconnue contaminée auxquels sont ajoutés, à chacun, 0.673g de charbon végétal actif.

Analyses sur eau terreuse : les témoins malades sont constitués de 2 pots de 150 mL avec un mélange de ¼ de terre reconnue contaminée pour ¾ de sable auxquels sont ajoutés ; à chacun, 0.673g de charbon végétal actif.

Analyses sur eau décantée : les témoins malades sont constitués de 2 pots de 150 mL avec un mélange de ½ de terreau stérile pour ½ de sable auxquels sont ajoutés, à chacun, 0.673g de charbon végétal actif. Ces témoins seront arrosés tout au long du test avec un mélange d'eau décantée de 300 mL de terre contaminée + 1 litre d'eau permutée, distillée ou osmosée.

Ces témoins malades sont ensuite ensemencés avec des graines de betteraves sensibles à la rhizomanie dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Dans les cas des analyses sur sol et sur eau terreuse uniquement, arroser avec de l'eau permutée, distillée ou osmosée.

Il est préférable d'effectuer les manipulations de ce témoin malade en dernier.

7. prise d'analyse (le cas échéant)

Analyses sur sol : Dans les jours suivant la réception et en fonction de l'humidité de l'échantillon, ce dernier est séché au dessiccateur lent (ou l'air libre) pour être tamisé à 5 mm avant stockage à température ambiante dans des contenants hermétiques. Le laboratoire veillera à éviter une trop grande dessiccation de la terre.

Ce stockage avant analyse ne pourra excéder un mois.

La prise d'essai pour analyse est constituée de 6 X 150 mL de terre (900mL) à analyser bien homogénéisée.

Analyses sur eau terreuse : la prise d'essai est constituée de 6 pots de 150 mL du mélange ¼ de phase solide récupérée après décantation et ¾ de sable.

Analyses sur eau décantée : la prise d'essai est constituée de 3 litres d'eau décantée.

8. Etapes de l'analyse

8.1. Test de piégeage

8.1.1. Analyses sur sol :

- Mélanger la terre à analyser de manière à bien homogénéiser l'échantillon.
- Incorporer 4.038g de charbon végétal actif (permet de capter les éventuelles molécules chimiques présentes dans le sol à analyser et responsables de phytotoxicité dans 900 mL de cette terre).
- Remplir 6 pots de 150 mL avec les 7/8^{ème} de ce mélange.
- Semer une vingtaine de graines de betteraves par pot voir plus si le taux de germination du lot de graines est faible.
- Compléter les 6 pots avec le mélange.
- Placer les 6 pots dans une barquette munie d'une nappe d'irrigation dans le fond.

- Arroser les pots par le fond par capillarité avec de l'eau permutée, distillée ou osmosée sans atteindre la saturation.
- Recouvrir les pots avec des couvercles transparents.
- Placer la barquette dans la chambre climatique réglée selon les indications données en 5.1.
- Surveiller la levée et enlever les couvercles dès que celle-ci à lieu.
- Arroser régulièrement les pots par le fond à saturation.
- **Eviter d'éclabousser lors de l'arrosage.**
- Analyser les plantes entre 21 et 28 jours après semis dans les pots.

8.1.2. Analyses sur eau terreuse :

Procéder comme au 8.1.1 en utilisant le mélange préparé à partir des éléments solides récupérés après décantation comme indiqué point 7.

8.1.3. Analyses sur eau décantée

- Mélanger 450 mL de terreau stérile et 450 mL de sable.
- Remplir 6 pots de 150 mL d u mélange.
- Procéder ensuite comme indiqué en 8.1.1 en arrosant chaque série de 6 pots avec l'échantillon d'eau décantée à analyser en remplacement de l'eau d'arrosage.

8.2. Dépotage

- Dépoter chaque pot individuellement afin de dégager les racines des débris (organiques et terreux) par lavage délicat à l'eau courante sur un tamis maillé de 1 à 2mm (qui a pour but de retenir les plantules et racines).
- Conserver les plantules nettoyées ainsi pot à pot.

Si l'analyse des échantillons par ELISA (MOA 01 partie B) est impossible dans les 24 heures suivant le dépotage, il est préférable soit de conserver les échantillons à $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ enrobés dans du papier aluminium afin d'éviter le dessèchement (48 heures maximum), soit à $<-15^{\circ}\text{C}$ pour une conservation plus longue dans une limite maximale de 6 mois.

8.3. Préparation des échantillons pour analyse par ELISA

L'échantillon pour analyse est constitué à partir des plantules ayant servi au piégeage et dont l'appareil racinaire a été lavé.

Pour chaque échantillon de sol reçu, choisir 5 pots de culture parmi les 6. Ces 5 pots servent chacun à la préparation de 5 sous-échantillons. Sur chaque pot effectuer un prélèvement sur tige et racines pour atteindre $0,5\text{g} \pm 0,1\text{g}$ par sous échantillon.

Les échantillons préparés peuvent être conservés quelques heures à $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ avant analyse.

Une deuxième prise d'essai de $0,5\text{g} \pm 0,1\text{g}$ sera effectuée si la quantité de plantules le permet, dans tous les cas le reste du matériel végétal, sera conservé soit à $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ pour une deuxième analyse dans les 48h suivant le dépotage si nécessaire, soit à $<-15^{\circ}\text{C}$ (pour une conservation maximale de 6 mois).

Remarque : Si la pesée de chaque sous échantillon n'atteint pas 0.5g, le ratio poids/tampon de broyage sera adapté. La pesée de chaque sous-échantillon ne peut pas être inférieure à 0.2g.

Les échantillons pour analyse sont prêts pour engager un test ELISA (voir MOA 011 partie B)

9. Résultats

Lors de la levée des plants, noter toute absence de levée ou levée partielle. Ceci permettra d'émettre une réserve sur le résultat d'analyse qui pourra préciser que « du fait d'une absence de levée suffisante des plantules de betteraves, l'analyse n'a pas pu être réalisée » et si possible demander un nouvel échantillon.

10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Afin d'éviter toute contamination de l'environnement via les eaux usées et les effluents, les eaux de lavage des plantes doivent être traitées avant rejet par un produit virucide répondant à la norme NF T 72-180 (efficacité sur les virus non enveloppés).

Tout fragment de végétal doit être détruit par autoclavage ou par trempage dans un produit répondant à la norme NF T 72-180.

Tout échantillon de terre ou eau terreuse ou décantée doit être désinfecté avant élimination.

11. Conservation des reliquats de matériels utilisés

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, jusqu'à au moins le dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
Directive 2000/29/CE modifiée, annexes IB et IVB	Directive de classement des organismes de quarantaine et définissant les zones protégées de l'Europe communautaire.
Décret 2006-7 du 4 janvier 2006	Décret 2006-7 du 4 janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural
Arrêté ministériel du 19 décembre 2007	Arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux
MOA 009 version 1a	Méthode d'analyse générale officielle Technique ELISA Bactériologie/Virologie
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV

REMERCIEMENTS

Le LNPV Station d'Angers remercie le LDA 22 et le laboratoire de Loos en Gohelle pour la relecture attentive de la version 1a de la présente méthode et les suggestions qu'ils ont formulées pour l'amélioration de cette dernière.

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

PROTOCOLE OEPP PM7/30 (2) 2006 OEPP/EPPO, *Beet necrotic yellow vein virus* (benyvirus).
Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 429–440

Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

**Laboratoire national de la protection des végétaux,
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr**

Ce document est édité par :

**Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr**

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.